

INTERACCIÓN ENTRE *Salvinia minima* Y *Lemna gibba*: EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO EN DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO

L. DE CABO¹, M. V. CASARES¹, R. SEOANE^{2, 3}

¹ Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia-CONICET
Av. Angel Gallardo 470 (1405) Buenos Aires, Argentina
ldecabo@macn.gov.ar

² Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires,
Av. Las Heras 2214, Buenos Aires, Argentina
rseoane@fi.uba.ar

³ Instituto Nacional de Agua-CONICET Au. Ezeiza-Cañuelas,
Tramo J. Newbery km 1.620 (1804) Buenos Aires, Argentina

ABSTRACT. Nutrient uptake and competitive ability of the aquatic species *Lemna gibba* and *Salvinia minima* were evaluated. The experiment was carried out in a greenhouse and plants were grown as mono-plant cultures and mixed-plant cultures. Three different media were used: tap water and the chemically defined media Lemna and Hutner 1/10. Duration of the experiment was 7 days. Initial and final dry weights and DIN and SRP concentrations were determined. Relative growth rates (RGR) and nutrient uptake rates were calculated. *L. gibba*'s RGR values increased significantly in Hutner 1/10 medium when types of cultures were analyzed separately. RGR values decreased in Lemna and Hutner 1/10 media in mixed-plant cultures. *S. minima* did not show significant differences in its RGR values. In mono-plant cultures N and P uptake rates in Lemna medium were significantly larger for *L. gibba*. In Hutner 1/10 medium P uptake rate was greater for *S. minima* and N uptake rate was larger for *L. gibba*. The presence of *S. minima* negatively affected *L. gibba*'s growth.

Key words: *Lemna gibba*, *Salvinia minima*, relative growth rate, nitrogen, phosphorous.

Palabras clave: *Lemna gibba*, *Salvinia minima*, tasa de crecimiento relativo, nitrógeno, fósforo.

INTRODUCCIÓN

Según Gopal y Goel (1993) la competencia en el medio acuático ocurre fundamentalmente entre especies con forma de crecimiento semejante que ocupan la misma posición en la columna de agua. *Lemna gibba* L., perteneciente al grupo de especies llamadas comúnmente lentejitas de agua, y *Salvinia minima* Baker, llamada comúnmente helechito de agua, son macrófitas flotantes que crecen formando carpetas en lagunas y arroyos de aguas quietas y se las encuentra frecuentemente juntas en los ecosistemas pampeanos. En algunas oca-

siones la elevada densidad que alcanzan puede producir la disminución en la difusión de oxígeno y en el pasaje de luz hacia la columna de agua. Ambas especies se reproducen vegetativamente y se caracterizan por tener una amplia distribución geográfica, rápido crecimiento y por ser sensibles a los cambios medioambientales (Olguín *et. al.*, 2005). *L. gibba* posee frondes suborbiculares, gibosas en la cara inferior, de 0,2-0,6cm de diámetro, generalmente reunidas de a tres, con una sola raíz. Se distribuye en zonas cálidas de todo el mundo y se emplea para purificar aguas servidas y absorber metales pesados (Lahitte y

Hurrell, 2004). *S. minima* es una especie flotante con hojas de 0,4-2cm que se encuentran uniformemente cubiertas por pelos que favorecen la flotación. Posee rizomas que se ramifican en forma horizontal justo debajo de la superficie del agua. Su rango de distribución abarca desde el Sur de México hasta Argentina y ha sido introducida en Estados Unidos y España (<http://salvinia.er.usgs.gov/html/identification1.html>).

La construcción de humedales artificiales para el tratamiento de efluentes domésticos e industriales se ha ido desarrollando rápidamente a lo largo de las últimas décadas y, actualmente, representa una alternativa de tratamiento aceptada y cada vez más común (Song *et al.*, 2006). Los efluentes domésticos y municipales, así como los provenientes de actividades agropecuarias e industriales, se caracterizan por tener una elevada carga de nutrientes. Li *et al.* (2008) han tratado, en humedales artificiales, aguas de un lago eutroficado con concentraciones del orden de los 3 mg/L de nitrógeno inorgánico y de 0,15 mg/L de fósforo total. Asimismo, Ciria *et al.* (2005) estudiaron el rol de *Typha latifolia* en el tratamiento de efluentes con un rango de nitrógeno inorgánico de 52,1-65 mg/L y 23-29 mg/L de fósforo. En nuestro país, Maine *et al.* (2009) han estudiado las variaciones en la dominancia y la remoción de metales pesados y nutrientes en un humedal artificial al que transplantaron *Eichhornia crassipes* y *Typha domingensis*. Se ha estudiado también la capacidad de remover metales pesados y nutrientes por varias especies de la familia Lemnaceae y del género *Salvinia* (Al Nozaily *et al.*, 2000; Hadad *et al.*, 2007; Maine *et al.*, 2004; Olguín *et al.*, 2005).

La disponibilidad de nutrientes afecta la estructura de la comunidad en ambientes acuáticos naturales (Tilman, 1984). Por lo tanto, la competencia entre especies se encuentra posiblemente influenciada por tal condición del medio, pudiendo modifi-

carse la interacción entre especies frente a distintas disponibilidades de nutrientes. Van *et al.* (1999) encontraron que *Hydrilla verticillata* era más competitiva que *Vallisneria americana* en condiciones de alta carga de nutrientes pero lo contrario ocurría en condiciones menos fértiles. Según Lambers *et al.* (1998), en experimentos a corto plazo especialmente en ambientes con recursos no limitantes, los rasgos que llevan a un rápido crecimiento contribuyen al éxito competitivo. Clatworthy y Harper (1962) realizaron experimentos de 6 días con distintas especies de los géneros *Lemna* y *Salvinia* y concluyeron que el éxito de una especie en cultivo mixto no podía predecirse a partir de los resultados obtenidos en cultivos puros. Es probable que varios factores adicionales influyan en la interacción competitiva como ser la filogenia (Webb *et al.*, 2006), competencia intraespecífica (Weiner, 1990;), disponibilidad del recurso (Grime, 1973) y sus interacciones (Bertness and Callaway, 1994).

Con vistas a evaluar la posibilidad de utilizar las especies *S. minima* y *L. gibba* en humedales artificiales de tratamiento de efluentes con elevadas cargas de nutrientes, el presente estudio se orientó a determinar las tasas de crecimiento relativas en cultivos puros y mixtos considerando, a su vez, la habilidad en la captación de nutrientes de cada una de las especies en distintos medios de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

L. gibba y *S. minima* fueron colectadas de estanques donde crecen en forma de monocultivos al aire libre. Se las trasladó al invernáculo donde se las mantuvo en recipientes con agua corriente para permitir su aclimatación. Durante 7 días se realizó un ensayo en invernáculo con tres medios nutritivos: agua corriente, medio nutritivo A (solución nutritiva *Lemna*, APHA – AWWA – WPCF, 1992) y medio nutritivo B (solución nutritiva

Hutner 1/10, modificada según Vermaat y Hanif, 1998). En cada medio nutritivo se analizó por quintuplicado el crecimiento de cada especie en monocultivo y en cultivo mixto (Tabla 1).

Se utilizaron bandejas plásticas de 66,5 cm² de superficie y 3 cm de profundidad en las que se colocaron 160 ml de medio nutritivo. Se seleccionaron individuos de aspecto saludable y uniforme. Se los lavó cuidadosamente con agua corriente y luego con agua desionizada y se dispusieron: 85-86 frondes de *L. gibba* y 63-64 frondes de *S. minima* en cada tratamiento de monocultivo y 35-36 y 38-39 frondes de *L. gibba* y *S. minima*, respectivamente, en los tratamientos de cultivo mixto. En todos los casos se buscó cubrir las 2/3 partes de la superficie. El fotoperíodo fue de 15:9hs (luz/oscuridad). Al finalizar el ensayo, se cosecharon las plantas y se colocaron en estufa a 60° C hasta peso constante para obtener los pesos secos (m_f). Los pesos secos iniciales (m_i) de ambas especies se estimaron a partir del peso seco determinado en plantas provenientes del mismo cultivo y con el mismo número de frondes que los utilizados

en los tratamientos anteriormente descriptos.

En los medios nutritivos se determinaron las siguientes variables: pH (ORION pHmetro 250A), temperatura, concentraciones iniciales y finales de fósforo reactivo soluble (PRS) con molibdato ascórbico, nitrato ($N-NO_3^-$) por reducción con sulfato de hidrazina, nitrito ($N-NO_2^-$) por diazotación, según Strickland y Parsons (1972). Amonio ($N-NH_4^+$) fue determinado por el método de indofenol azul de acuerdo a Mackereth et al. (1989). La concentración de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) fue calculada como la suma de amonio, nitrato y nitrito. Se calcularon las tasas medias de consumo de N y P según la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa media de consumo} = (C_i - C_f) / \Delta t \cdot m_f,$$

donde C_f y C_i son las cargas (μg) finales e iniciales de N y P determinadas en cada bandeja, Δt es el tiempo (días) de duración del ensayo y m_f es el peso seco final (gr) de cada especie en cada tratamiento.

Tabla 1. Diseño experimental.

Medio nutritivo	Tipo de Cultivo	Especie
Agua corriente	Monocultivo	<i>S. minima</i>
	Monocultivo	<i>L. gibba</i>
	Mixto	<i>S. minima</i> + <i>L. gibba</i>
Lemna	Monocultivo	<i>S. minima</i>
	Monocultivo	<i>L. gibba</i>
	Mixto	<i>S. minima</i> + <i>L. gibba</i>
Hutner 1/10	Monocultivo	<i>S. minima</i>
	Monocultivo	<i>L. gibba</i>
	Mixto	<i>S. minima</i> + <i>L. gibba</i>

Se estimó la tasa de crecimiento relativa RGR (mg/mg.día) según la ecuación propuesta por Hunt (1978):

$$\text{RGR} = (\ln m_f - \ln m_i) / \Delta t$$

donde m_f y m_i corresponden al peso seco final e inicial respectivamente, y Δt representa el tiempo transcurrido en el ensayo.

Se examinó la distribución normal (test de Lilliefors) y la homogeneidad de varianza (test de Levene) para las variables RGR y tasa de consumo de nutrientes. Los valores de RGR se compararon aplicando ANOVA de dos factores (medio nutritivo y tipo de cultivo). Las tasas de consumo de nutrientes para cada medio nutritivo se compararon mediante ANOVA entre especies. Se realizaron comparaciones con el test de Fisher cuando se hallaron diferencias significativas entre tratamientos (Zar, 1996). Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc. 1984-2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rango de pH fue de 7-8,5 en los distintos tratamientos. En cuanto a la temperatura media de los medios de cultivo fue 13° C.

Los valores de biomasa inicial para cada especie fueron de 0,1437g y 0,0515g en monocultivo y 0,0898g y 0,0241g en cultivo mixto para *S. minima* y *L. gibba*, respectivamente. El rango de RGR para *L. gibba* en monocultivo (Tabla 2), fue 91,42-124,15 día⁻¹. Estos valores se encontraron dentro del rango informado por Körner (2001) para cultivos de la especie en efluentes domésticos. Por otro lado, los valores de RGR para *S. minima* variaron entre 57,47-65,31 día⁻¹, estando este rango incluido en los valores señalados por la bibliografía para *Salvinia molesta* (Rani & Bhambie, 1983) y *Salvinia natans* (Miki *et al.*, 2006).

Tabla 2. Tasa de crecimiento relativa media (RGR) de las especies *S. minima* y *L. gibba* según el tipo de cultivo y medio nutritivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tipos de cultivos para cada medio nutritivo y cada especie.

Medio de Cultivo	Especie	RGR (día ⁻¹)	
		Monocultivo	Cultivo mixto
Agua corriente	<i>S. minima</i>	62,57 ± 8,66	64,41 ± 16,32
	<i>L. gibba</i>	91,42 ± 10,5	75,67 ± 6,8
Lemna	<i>S. minima</i>	57,47 ± 9,93	50,37 ± 12,2
	<i>L. gibba</i>	97,95 ± 9,3a	71,15 ± 2,24b
Hutner 1/10	<i>S. minima</i>	65,31 ± 7,96	56,34 ± 14,02
	<i>L. gibba</i>	124,15 ± 21,3a	99,6 ± 18,6b

Tabla 3. Estadístico F; nivel de significación (p) y grados de libertad (GL) del ANOVA de dos factores aplicado a RGR para *S. minima* y *L. gibba*.

	<i>S. minima</i>			<i>L. gibba</i>		
	Medio nutritivo	Tipo de Cultivo	Interacción	Medio nutritivo	Tipo de Cultivo	Interacción
	1,7227	1,1901	0,5888	14,752	21,431	0,487
GL	2	1	2	2	1	2
p	0,19994	0,2861	0,5628	<0,0001	<0,001	0,6204

Tabla 4. Concentración inicial y final de P y N en cada medio nutritivo para *S. minima* y *L. gibba* en monocultivo.

Medio nutritivo	Nutriente	Concentración inicial (µg/L)	Concentración final (µg/L)	
			<i>S. minima</i>	<i>L. gibba</i>
A	Fósforo	594	15,7 ± 11,5	212,3 ± 25,5
	Nitrógeno	39610	1440,9 ± 337,2	1162,6 ± 468,5
B	Fósforo	2023	1560,9 ± 178,9	1995,9 ± 57,3
	Nitrógeno	7860	3565,3 ± 611,9	3632,9 ± 674,2

En la Tabla 4 se muestran las concentraciones iniciales y finales de P y N en cada medio nutritivo para cada especie en monocultivo. El medio nutritivo A está caracterizado por ser muy rico en nitrógeno respecto al fósforo en una relación N:P = 67:1. El medio nutritivo B, en cambio, presenta una relación N:P = 4:1 notoriamente reducido en nitrógeno y rico en P respecto al medio propuesto por (APHA – AWWA – WPCF, 1992). En medio nutritivo A, *S. minima* removió casi totalmente el P (98%) y N (97%) presentes. *L. gibba*, por otro lado, removió el 65% del P y casi la totalidad (98%) del N. En medio nutritivo B, *S. minima* removió el 23% del P y el 55%

del N y *L. gibba* casi no consumió P (2%) y redujo el N al 54%. Las concentraciones finales de N y P alcanzadas en los tratamientos en los medios nutritivos A y B fueron superiores a las concentraciones medidas en el tratamiento con agua corriente, en el cual, a pesar de las bajos niveles de nutrientes se registró crecimiento. Por lo tanto, podemos asegurar que para el tiempo en el cual se desarrolló el ensayo no se llegó a un nivel de nutrientes tan bajo como para producir un cese del crecimiento. Además, en ningún tratamiento en monocultivo las frondes llegaron a superponerse, no existiendo efecto de sombreado ni interferencia por espacio.

Tabla 5. Tasa de consumo de P y N de las especies *S. minima* y *L. gibba* creciendo en monocultivo en cada medio nutritivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre especies analizando cada medio nutritivo por separado.

Medio nutritivo	Nutriente	Tasas de consumo ($\mu\text{g}/\text{día.g}$)	
		<i>S. minima</i>	<i>L. gibba</i>
A	Fósforo	62,13a	88,02b
	Nitrógeno	4105,5a	8859,8b
B	Fósforo	46,7a	6,68b
	Nitrógeno	433,9a	713,2b

Con los valores de las concentraciones iniciales y finales de N y P (Tabla 4) y las biomásas finales de *S. minima* y *L. gibba* se calcularon las tasas de consumo (Tabla 5). En los monocultivos en medio nutritivo A, las tasas de consumo de P y N de *L. gibba* resultaron significativamente superiores a las de *S. minima*. En medio nutritivo B, *L. gibba* mostró una tasa de consumo de nitrógeno mayor y una tasa de consumo de P menor respecto a *S. minima*. Según Al Nozaily *et al.* (2000), la absorción de nutrientes resulta proporcional a las tasas de crecimiento. Sin embargo, los valores de RGR de *L. gibba* estimados para los tratamientos en medio nutritivo B fueron significativamente superiores ($p < 0.0001$) a los estimados en medio nutritivo A. Asimismo, *S. minima* mostró una tasa de consumo de N significativamente mayor en medio A y los RGR estimados para esta especie no resultaron significativamente diferentes entre medios.

Las altas tasas de consumo en medio A por parte de ambas especies, podría llegar a explicarse, en parte, por un consumo luxuriante que no se ve reflejado en un aumento en las tasas de crecimiento. El mayor crecimiento de *L. gibba* en medio B no parece estar relacionado con el consumo de N y/o P, es posible que otros de los macro o micronutrientes del medio (NH_4^+ , Cl^-) sean los responsables del mayor crecimiento. En el medio nutri-

tivo A, los nutrientes se agregaron como sales de cloruros y en el medio B, como sales de sulfatos.

La comparación entre RGR de los distintos tipos de cultivo (monocultivo y cultivo mixto) permite estudiar la posible competencia por interferencia entre especies. Grime (1977) sugiere que las especies con mayor tasa de crecimiento relativa son competidoras más efectivas. Sin embargo, Tilman (1988) sugirió que las especies capaces de acceder a recursos en niveles más bajos que el resto de las especies con las que se encuentran interactuando son las mejores competidoras. Por otro lado, según Lambers *et al.* (1998) los efectos de la competencia son igualmente observables en ambientes con altos y bajos niveles de recursos. La disminución del RGR de *L. gibba* creciendo en cultivo mixto con *S. minima* permite afirmar que la presencia de esta última afectó negativamente el crecimiento de *L. gibba*, en los medios nutritivos aplicados y en el rango de temperaturas del presente ensayo. Aunque las especies no llegaron a superponerse, el mayor tamaño de *S. minima* podría interferir en la recepción de luz por parte de *L. gibba*.

Dada la eficiente remoción de nutrientes por *S. minima* y *L. gibba*, ambas resultarían recomendables para el tratamiento de efluentes con exceso de nutrientes en humedales artificiales o naturales. Sin embargo, en un humedal vegetado por ambas especies, que

reciba una elevada carga de N y P se produciría, en el corto plazo, una disminución en el crecimiento de *L. gibba*, no viéndose afectado el crecimiento de *S. minima*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subsidiado por la Universidad de Buenos Aires, Proyecto UBACyT IO-28.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Nozaily, F., Alaerts, G., Veenstra, S.** 2000. Performance of Duckweed-covered sewage lagoons-II. Nitrogen and Phosphorous balance and plant productivity. *Water Research* 34 (10), 2734-2741 pp.
- APHA – AWWA – WPCF.** 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ed. Díaz de Santos. S. A. Madrid, España.
- Bertness, M. D., Callaway, R.**, 1994. Positive interactions in communities. *Trends in Ecological Evolution* 9, 191-193.
- Ciria, M. P., Solano M. L., Soriano P.** 2005. Role of macrophyte *Typha latifolia* in a constructed wetland for wastewater treatment and assessment of its potential as a biomass fuel. *Biosystems Engineering* 92(4), 535-544.
- Clatworthy, J. N. & Harper J. L.** 1962. The comparative biology of closely related species living in the same area. 5. Inter- and intraspecific interference within cultures of *Lemna* spp. and *Salvinia natans*. *Journal of Experimental Botany* 13, 307-324 pp.
- Gopal, B. & Goel U.** 1993. Competition and allelopathy in aquatic plant-communities, *Botanical Review* 59, 155-210 pp.
- Grime, J. P.**, 1973. Competitive exclusion in herbaceous vegetation. *Nature* 242, 344-347.
- Grime, J. P.** 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American Naturalist* 111, 1169-1195 pp.
- Hadad, H. R., Maine M. A., Natale G. S., Bonetto C.** 2007. The effect of nutrient addition on metal tolerance in *Salvinia herzogii*. *Ecological Engineering* 31, 122-131
- Hunt, R.** 1978. Plant growth analysis. *Studies in Biology* No 96. Edward Arnold Ltd., London, 67 pp.
- Körner, S., S. K. Das, S. Veenstra, Vermaat, J. E.** 2001. The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in waste water and its toxicity to *Lemna gibba*. *Aquatic Botany* 71, 71-81 pp.
- Lahitte, H. B. y Hurrell, J. A.** 2004. Biota Rioplatense I. Plantas de la Costa. Ed. L.O.L.A. Buenos Aires 200 pp.
- Lambers, H., Stuart Chapin III, F., Pons, T.** 1998. Plant Physiological Ecology. Springer- Verlag, New York 539 pp.
- Li, L., Li, Y., Biswas, D. K., Nian, Y., Jiang, G.** 2008. Potential of constructed wetlands in treating the eutrophic water: Evidence from Taihu Lake of China. *Bioresource Technology* 99, 1656-1663.
- Mackereth, F., Heron, J., Talling, J.** 1989. Water Analysis: some revised methods for limnologists. (Kendal: Titus Wilson and Son Ltd.)
- Maine, M. A., Suñé, N. L., Lager, S.** 2004. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Research* 38, 1494-1501.
- Maine, M. A., Suñé, N. L., Hadad, H., Sánchez, G., Bonetto, C.** 2009. Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland. *Journal of Environmental Management* 90, 355-363.

- Miki, A., Hiroaki, I., Kazuyuki, I., Kenji, U.** 2006. Effects of five rice herbicides on the growth of two threatened aquatic ferns. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63 (3), 463-468 pp.
- Olguín, E., Sánchez-Galván, G., Pérez-Peréz, T., Pérez-Orozco, A.** 2005. Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of Pb (II) in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32, 577-586.
- Rani, V. U. & Bhambie, S.** 1983. A study of the growth of *Salvinia molesta* in relation to light and temperature. *Aquatic Botany* 17, 119-124 pp.
- Song, Z., Zheng, Z., Li, J., Sun X., Wuang, W., Xu, M.**, 2006. Seasonal and annual performance of a full-scale constructed wetland system for sewage treatment in China. *Ecological Engineering* 26, 272-282
- Strickland, J. & Parsons T.** 1972. A practical Handbook of Seawater Analysis. Bull. No 167. (Ottawa: Fisheries Research Board).
- Tilman, G. D.**, 1984. Plant dominance along an experimental nutrient gradient. *Ecology* 65, 1445-1453.
- Tilman, G. D.** 1988. Dynamics and structure of plant communities. In: *Monographs in Population Biology* 26, Princeton University, Press, NJ 360 pp.
- Van, T.K., Wheeler, G. S., Center, T.D.**, 1999. Competition between *Hydrilla verticillata* and *Vallisneria americana* as influenced by soil fertility. *Aquatic Botany* 62, 225-233.
- Vermaat J. E. & Hanif M. K.** 1998. Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and the water-fern *Azolla filliculoides* on different types of wastewater. *Water Research* 32, 2569-2576 pp.
- Webb, C. O., Gilbert, G. S., Donoghue, M. J.**, 2006. Phylodiversity dependent seedling mortality, size structure, and disease in a Bornean rain forest. *Ecology* 87, S123-S131.
- Weiner, J.**, 1990. Asymmetric competition in plant populations. *Trends in Ecology Evolution* 5, 360-364.
- Zar, J. H.** 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. 661 pp.